

28. 7. 2004

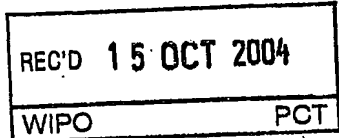
日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 6月30日

出願番号  
Application Number: 特願2003-188626  
[ST. 10/C]: [JP2003-188626]



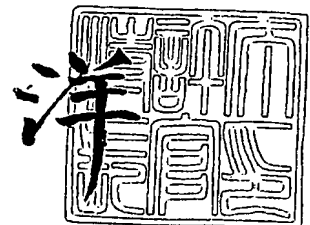
出願人  
Applicant(s): エーザイ株式会社  
越智 光夫

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願

【整理番号】 EP03SM0004

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15

【発明者】

【住所又は居所】 広島市南区霞 1 - 2 - 3 広島大学大学院医歯薬学総合  
研究科内

【氏名】 越智光夫

【特許出願人】

【識別番号】 000000217

【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代表者】 内藤晴夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004983

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

**【書類名】 明細書****【発明の名称】** 磁性細胞およびそれらの使用方法**【特許請求の範囲】****【請求項 1】** 細胞表面に磁性粒子を保有する磁性細胞。**【請求項 2】** 細胞表面と磁性粒子がリンカーを介して結合した請求項 1 記載の磁性細胞。**【請求項 3】** 磁性粒子が、少なくとも磁性粒子を包含し、更に薬物を包含する粒子である請求項 2 記載の磁性細胞。**【請求項 4】** 細胞表面とリンカーが抗原抗体反応で結合した請求項 2 または 3 の磁性細胞。**【請求項 5】** リンカーと磁性粒子が化学結合により結合した請求項 2 または 3 記載の磁性細胞。**【請求項 6】** 細胞内に磁性粒子を含有する磁性細胞。**【請求項 7】** 細胞が軟骨培養細胞、間葉系細胞またはリンパ球細胞のいずれか 1 である請求項 1 ～ 6 いずれか 1 項記載の磁性細胞。**【請求項 8】** 請求項 1 ～ 7 いずれか 1 項記載の磁性細胞を病巣部位に留置し、磁場により磁性細胞を病巣部に長期間滞留させる方法。**【請求項 9】** 請求項 8 において、磁場を体外から病巣部にあてるか又は体内に磁石を埋め込むことにより磁性細胞を病巣部に長時間滞留させる方法。**【請求項 10】** 請求項 1 記載の磁性細胞及び薬物を包含する磁性粒子とを同時にまたは別々に病巣部に投与し、薬物内包材からの薬物放出により磁性細胞の活動を制御する方法。**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明が属する技術分野】**

本発明は、新規で有用な磁性細胞およびその使用方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

一般に薬物は投与後全身に分布するため、抗がん剤を始めとする副作用の強い薬

物は、作用部位に高濃度に存在し、その他の部位には分布しないことが好ましい。薬物を局所に集中させるためにさまざまな試みがなされているが、その一つとして磁気粒子を用いて外部から磁力により薬物を局所に集中させる方法が試みられている。例えば、磁気粒子を薬物とともにリポソームに包含させて投与し、磁力により局所へ誘導し、薬物の局所濃度を高めることが可能である。(非特許文献1参照)

一方、マグネタイト等のフェリ磁性体と高分子からなる磁気ビーズ表面を抗体で修飾し、抗原抗体反応を利用して細胞の分離生成を行う技術が知られており、HLAのタイピング、造血幹細胞の選別などに応用されている。(非特許文献2参照)

#### 【0003】

【非特許文献1】日本口腔外科学会誌1997年2月号p55-61

【非特許文献2】バイオマテリアル2003年2月号p113-119

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかし、再生医療等での応用が可能な間葉系細胞や軟骨細胞等の細胞に磁気粒子を結合した例は知られていない。このため、磁気粒子を結合した細胞が投与後外部からの磁気により局所に滞留するか否か、また細胞が本来の働きをするか否か等、解決すべき未知な課題が多い。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者らが鋭意研究した結果、本願発明を完成するに至った。すなわち、本発明は

- 1) 細胞表面に磁性粒子を保有する磁性細胞；
- 2) 細胞表面と磁性粒子がリンカーを介して結合した1)記載の磁性細胞；
- 3) 磁性粒子が、少なくとも磁性粒子を包含し、更に薬物を包含する粒子である2)記載の磁性細胞；
- 4) 細胞表面とリンカーが抗原抗体反応で結合した2)または3)の磁性細胞；
- 5) リンカーと磁性粒子が化学結合により結合した2)または3)記載の磁性細胞

胞；

6) 細胞内に磁性粒子を含有する磁性細胞；

7) 細胞が軟骨培養細胞、間葉系細胞またはリンパ球細胞のいずれか1である1)～6) いずれか1記載の磁性細胞；

8) 1)～7) いずれか1記載の磁性細胞を病巣部位に留置し、磁場により磁性細胞を病巣部に長期間滞留させる方法；

9) 8) において、磁場を体外から病巣部にあてるか又は体内に磁石を埋め込むことにより磁性細胞を病巣部に長時間滞留させる方法；

10) 1) 記載の磁性細胞及び薬物を包含する磁性粒子とを同時にまたは別々に病巣部に投与し、薬物内包材からの薬物放出により磁性細胞の活動を制御する方法；

に関する。

#### 【0006】

本発明に用いる磁性粒子における磁氣的性質としては、磁性を有するものであれば何でもよく、常磁性であっても、超常磁性であっても、強磁性であってもよく、強磁性にはフェロ磁性の他、フェリ磁性も含まれる。具体的にはマグネタイト、マグヘマイトその他鉄、コバルト、ニッケル等の強磁性元素の化合物粒子である。かかる強磁性化合物のうち、マグネタイトやマグヘマイトは生体に対して毒性を示さず、かつ安定である点において好ましいものである。特にマグネタイトが好ましい。

#### 【0007】

磁性粒子は、上記強磁性化合物粒子単独である場合のみならず、セルロース、スターチ、デキストラン、アガロース、メタクリレートやスチレンなどで抱埋していてもよく、また磁性細菌が生合成する、マグネタイトがリン脂質で被覆された磁性粒子も含まれる。

#### 【0008】

「細胞表面に磁性粒子を保有」する方法としては、細胞表面の反応性官能基と磁性粒子の反応性官能基とを共有結合により直接的に結合する方法やリンカーを介して間接的に結合する方法等が挙げられる。リンカーとしては、両末端にカルボ

キシル基やアミノ基等の反応性官能基を有する化合物（以下、「二官能性スペーサー」と略する）若しくは抗体を挙げることができる。リンカーを用いる場合、リンカーと磁性粒子との結合は化学結合（共有結合、イオン結合、水素結合等）で結合するのが好ましい。細胞と磁性粒子との結合方法は、例えば磁性細菌を粉碎して得られた、リン脂質膜で覆われた磁性粒子と二官能性スペーサーを介して細胞表面の反応性官能基とを結合させる方法や表面がカルボキシル基で修飾された磁性粒子とリンカーとして用いる抗体のアミノ基とを化学結合の一つであるアミド結合させたものに細胞表面のHLAやCD44等の接着分子とを抗原抗体反応を介して結合する方法等が好ましい例として挙げられる。

#### 【0009】

「細胞内部に磁性粒子を含有」させる方法としては、磁性粒子を例えば特開平6-133784号記載のパーティクルガンによる方法により行うことができる。以上詳述したように本発明における磁性細胞とは磁性粒子が細胞内に含有されていても、細胞表面に結合していても、細胞表面からリンカーを介して結合していてもいずれであってもよい。

#### 【0010】

本発明における細胞としては、いかなる細胞であっても良いが、特にリンパ球細胞、間葉系幹細胞、軟骨培養細胞等が好ましい。

#### 【0011】

本発明における磁性粒子の形態の一つとして、例えばリポソームの如き内包材があげられ、リポソームには磁性粒子の他、細胞の働きを制御しうる薬物を含有させることができる。また、リポソームのみならず他のタイプの内包材を用いることも可能であり、イオン交換樹脂、結晶性セラミック、生体適合性ガラス、ラテックスに包含されてもよいし、種々の界面活性剤とともにマイクロスフェアとして使用してもよい。更に、ナノスフェアおよび他の脂質、ポリマーまたはタンパク質材料を用いることもできる。直径としては、数十～数百nmのものが好ましいが、特に限定されない。また、かかる薬物内包材は少なくとも磁性粒子を包含し、一方で薬物を包含していてもよいし包含しなくてもよいが、細胞の制御の観点から包含しているのが好ましい。

## 【0012】

本発明における薬物内包材、例えばリポソームは薬物放出制御のための薬物放出制御手段を設けていてもよく、薬物放出速度制御手段としては、高分子、温度感受性分子、超音波および／または磁気感受性物質が挙げられるが、例えば特開平 5-228358 号記載の曇点を有する高分子化合物（ポリアクリル酸系ポリマー）や特開平 11-92360 号記載の超音波感受性物質（ポルフィリン誘導体やキサンテン誘導体等）等が挙げられる。

## 【0013】

本発明における薬物とはサイトカインの如く、細胞の情報伝達系を司る物質を始めとする生理活性物質などが挙げられる。サイトカインとしては、インターフェロン類（IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 等）やインターロイキン類（IL-1～18等）、リンホトキシン類、腫瘍壊死因子（TNF $\alpha$ 等）、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージ・コロニー刺激因子（M-CSF、CSF-1）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、エリスロポエチン（EPO）、 тромбоポエチン（TPO）、造血幹細胞因子（SCF）、単球走化活性化因子（MCAF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ ）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、上皮細胞増殖因子（EGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、神経細胞増殖因子（NGF）等が挙げられる。特に、インターフェロン類、インターロイキン類、腫瘍壊死因子、エリスロポエチン、 тромбоポエチン、トランスフォーミング増殖因子、線維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、神経細胞増殖因子が好ましい。

## 【0014】

本発明にかかる磁性細胞を模式的に表したものを図 1 で示す。

## 【0015】

本発明における「磁性細胞を病巣部に長時間滞留させる」とは、磁性細胞の有している機能を発揮するのに十分な時間滞留させることをいい、1～90 日程度の期間が好ましい。

## 【0016】

本発明にかかる磁性細胞を投与する部位としては、体内に病巣を有する部位又は治療を施した部位であればどこでもよく、例えば脳、骨、肝臓、心臓、関節などが挙げられる。疾患名として脳卒中、悪性腫瘍、脊髄損傷、軟骨欠損、筋肉欠損、靱帯損傷などが挙げられる。

#### 【0017】

本発明にかかる磁性細胞の体内へ留置させるための投与方法は、外科的な手術によって投与してもよく、また注射によって投与してもよい。外科的な投与とは例えば骨に穴をあけて投与するようなことを意味し、注射投与とは注射により患部に直接投与することや静脈注射により全身に投与することを意味する。

#### 【0018】

本発明における磁場は磁性粒子の磁化のために60 Gauss（以下「G」と記す）以上が好ましく、より好ましくは体内における拡散を防ぎ局所に滞留させるため70 G以上がより好ましい。また、磁場は体外から与えてもよく、体内に磁石を埋め込むことにより与えても良い。かかる場合、磁石としては磁力、安定性や強度の点からネオジム磁石が好ましい。

#### 【0019】

本発明における「磁性細胞の活動を制御する」とは、サイトカインなどの薬物により分化や増殖など細胞の活動を制御することをいう。

#### 【0020】

磁性細胞と薬物内包材は同時にであってもよく、また別々に投与しても良く、例えばその形態として磁性細胞及び薬物内包材をそれぞれ注射剤にしたものを1つのパッケージにしたような医薬キットなどが挙げられる。

#### 【0021】

##### 【発明の実施の形態】

##### 【実施例】

以下に、実験例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるべきものではない。

#### 【0022】（磁性細胞の調製）

##### 1. 磁気ビーズの活性化



磁気ビーズであるフェリスフェア100C原液(50mg/ml)(日本ペイント製)から3mg相当(60 $\mu$ l)とり、0.01N NaOHを加え、ミキサーで10分間、室温で攪拌して洗浄した。この洗浄操作をもう一度繰り返して、脱イオン水を加え、ミキサーで5分間、室温で攪拌して洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した。磁気ビーズを活性化させるため、余分な水分を除去後、予め25mM 2-[N-モルフォリノ]エタン スルホン酸(2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid)(以下「MES」という)(SIGMA社製)pH5.0で50mg/mlに調製していた1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド 塩酸塩(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)(SIGMA社製)とN-ヒドロキシスクシンイミド(N-hydroxy succinimide)(SIGMA社製)を50 $\mu$ lずつ、及び磁気ビーズをチューブ内でよく混合し、30分間、室温でゆっくりと転倒攪拌した。反応後のチューブをネオジム磁石の上に2分間置き、上清を除去した。最後に、25mM MES、pH5.0で2回洗浄し、最終的な溶液体積を40 $\mu$ lにした。

#### 【0023】

##### 2. 活性化後の抗体の固定化

60 $\mu$ lの25mM MESでラットのCD44抗体(20 $\mu$ g)(CHEMICON社製)を溶解し、上記活性化ビーズに添加し、3時間、室温でゆっくりと転倒攪拌させ、活性化ビーズへ抗体を固定化した。反応後のチューブをネオジム磁石の上に2分間置き、上清を除去した。ビーズと反応していない抗体を除くため、リン酸緩衝液中の0.05M エタノールアミンを添加し、1時間室温でゆっくりと転倒攪拌した。固定化されたビーズを0.5% BSA(SIGMA社製)のリン酸緩衝液で4℃、5分間洗浄した。この洗浄操作を4回繰り返した。1mlの0.5% BSAのリン酸緩衝液で懸濁して4℃で保存した。

#### 【0024】

##### 3. 固定化ビーズの細胞への結合

培養したラット骨髓間葉系幹細胞をdishからはがしてチューブに移し、4℃

に10分間保存しておく。細胞懸濁液 ( $1 \times 10^6$  cells) に調製した上記ビーズを  $60 \mu\text{l}$  添加した後、 $4^\circ\text{C}$  で1時間ゆっくりと転倒攪拌して、抗原抗体反応させた。反応後のチューブをネオジム磁石の上に2分間置き、上清を除去した。 $0.5\%$  BSAのリン酸緩衝液で再懸濁する。この洗浄操作を4回行った。リン酸緩衝液などに懸濁して実験に使用した。

【0025】 (磁性リポソームを有する磁性細胞の調製)

1. N- [3- (2-ピリジジチオ) プロピオニル] フォスファチジルエタノールアミン (N- [3- (2-pyridyldithio) propionyl] phosphatidylethanolamine) (以下「PDP-PE」という) の合成

無水エタノール3mlに25mgのN-スクシンイミジル 3- (2-ピリジジチオ) プロピオン酸 エステル (N-succinimidyl 3- (2-pyridyldithio) propionate) と  $50 \mu\text{mol}$  のトリエチルアミンを溶解し、さらに  $50 \mu\text{mol}$  のフォスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine) を溶解し攪拌した。5時間後、メタノールを減圧除去し、残留物をクロロホルムにて溶解した。 $150^\circ\text{C}$  で一晩活性化したシリカゲルカラム (10ml) をクロロホルムで洗浄した。洗浄後反応物をカラムに流し、さらに20mlのクロロホルムで洗浄した。40:1、30:1、25:1、20:1および15:1のクロロホルム:メタノール混合溶液をそれぞれ20ml流して、最後に10:1の混合溶液を60ml流した。15:1および10:1の流出物を合わせて減圧濃縮した。

【0026】

2. リポソームの調製

卵黄フォスファチジルコリン (Egg phosphatidylcholine)  $10 \mu\text{mol}$ 、コレステロール (cholesterol)  $10 \mu\text{mol}$  およびPDP-PE  $1 \mu\text{mol}$  を3mlのジエチルエーテルに溶解し、ジエチルエーテルを減圧気化した。磁性体鉄 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) 5mgおよび封入薬物 (TGF- $\beta$ 、bFGF) を含んだ $0.9\%$ 生理食塩水1mlおよびホウ酸/クエン酸バッファー (pH 6.0) を加え、ボアテックスミキサーを用い振とう、フラスコ

内に付着した薄層被膜を完全に剥離した。Bath sonicator (同上) にて50分超音波処理した。0.45Tの永久磁石 (同上) を用い、作成した磁性体リポソームおよび封入されていない磁性体を溶液から分離した。1000 x g (p p m) にて15分間遠心分離し、上澄みである磁性体リポソームと沈殿物の封入されていない磁性体を分離した。

#### 【0027】

##### 3. リポソームと抗体との結合

60  $\mu$  l の25 mM MESでヒトCD44抗体 (20  $\mu$  g) を溶解し、作成したリポソームを添加し、3時間室温にてゆっくりと転倒攪拌させ、リポソームへ抗体を固定化した。反応後ネオジム磁石の上に2分間置き、上清を除去した。未反応の抗体を除去するため、0.05 Mエタノールアミンのリン酸緩衝液を添加し、1時間、室温でゆっくりと転倒攪拌した。0.5% BSAのリン酸緩衝液で4℃、5分間洗浄した。この洗浄操作を4回繰り返した。1 ml の0.5% BSAのリン酸緩衝液で懸濁安定化して4℃保存した。

#### 【0028】

##### 4. 抗体が固定化されたリポソームの細胞への結合

培養したヒト骨髓間葉系幹細胞をdishから剥がしてチューブに移し、4℃に10分間保存した。細胞懸濁液 (1  $\times$  10<sup>6</sup> cells) 辺りに調製したリポソームを添加した後、4℃で1時間、ゆっくりと転倒攪拌して、抗原抗体反応させた。反応後のチューブをネオジム磁石の上に2分間置き、上清を除去した。0.5% BSAリン酸緩衝液で再懸濁した。この洗浄操作を4回行った。リン酸緩衝液などに懸濁したままで実験に使用した。

#### 【0029】

##### 実験例1

##### (In vitro試験)

前述の方法により調製した磁性粒子と結合した骨髓間葉系幹細胞 4  $\times$  10<sup>6</sup> cells をシャーレに播いた。実施例においては、シャーレの下部中央に4300 Gの円形 (直径5 mm) のネオジム磁石を設置した。一方、比較例においては、磁石を設置しなかった。シャーレにTGF- $\beta$ とデキサメタゾンを加えた。21

日間培養後、トルイジンブルー染色により評価した。実施例においては軟骨様組織が磁石に相当する位置を中心に局在的に形成されていた。一方、比較例においては、軟骨様組織は局在的に形成されてはいなかった。

#### 【0030】

##### 実験例 2

(ラビットの膝間部における骨欠損修復)

ラビットの膝関節部にバイオインダストリー 2002.VOL. 19. No. 6 p 47-53 記載の方法に準じ、幅 5 mm の骨欠損を 2 箇所作成した。当該欠損部に実施例で得られた磁性細胞を 3.0  $\mu$ g 注射投与した。その後、700 G の磁場をもつ磁石を欠損部にあたる表面に 9 週間留置した。一方、比較例として外部磁場与えずに磁性細胞を投与した。その結果、実施例では軟骨細胞が骨欠損部で局在し、新生骨の架橋形成による骨欠損の修復が見られたが、一方外部磁場を与えなかった比較例では骨欠損の修復が見られなかった。

#### 【0031】

##### 【発明の効果】

本願にかかる発明である磁性細胞は体外からの磁場により、長期間病巣部に留置することができるため、効果的に該細胞本来の有する機能を発現することができる。

#### 【0032】

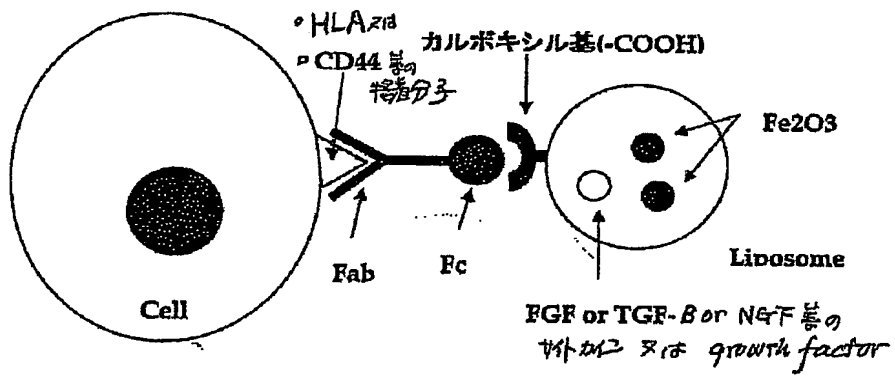
##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

本発明にかかる磁性細胞を模式的に表した図である。

【書類名】 図面

【図 1】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 再生医療などでの応用が可能な間葉系細胞や軟骨細胞等の細胞に磁気粒子を結合した例は知られていないため、磁気粒子を結合した細胞が投与後外部からの磁気により局所に滞留するか否か、また細胞が本来の働きをするか否か等、解決すべき課題がある。

**【解決手段】**

間葉系細胞や軟骨培養細胞の表面と磁性粒子を結合させた磁性細胞を提供し、それを体内に投与し外部から磁場を与えることにより、長期間病巣部に該細胞を留置させることが可能となった。

**【選択図】** なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-188626
受付番号	50301093593
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 7月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 6月30日

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 E0006TW04W  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-188626  
【承継人】  
【持分】 9/10  
【住所又は居所】 広島市南区霞 1 - 2 - 3 広島大学大学院医歯薬学総合研究科  
【氏名又は名称】 越智 光夫  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100079108  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 稲葉 良幸  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100080953  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 田中 克郎  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100093861  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 大賀 真司  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 011903  
【納付金額】 4,200円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 一部譲渡証書 1  
【援用の表示】 平成 1 6 年 6 月 1 0 日付手続補足書に添付のものを援用する。  
【物件名】 委任状 1  
【援用の表示】 平成 1 6 年 6 月 1 0 日付提出の手続補足書に添付のものを援用する。



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-188626
受付番号	50400978356
書類名	出願人名義変更届
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成16年 7月16日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】 平成16年 6月10日

## 【承継人】

【識別番号】 504224061

【住所又は居所】 広島県広島市南区霞1-2-3 広島大学大学院  
医歯薬学総合研究科

【氏名又は名称】 越智 光夫

## 【承継人代理人】

【識別番号】 100080953

【住所又は居所】 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森  
タワー23階 TMI 総合法律事務所

【氏名又は名称】 田中 克郎

## 【承継人代理人】

【識別番号】 100093861

【住所又は居所】 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森  
タワー23階 TMI 総合法律事務所

【氏名又は名称】 大賀 真司

## 【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100079108

【住所又は居所】 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森  
タワー23階 TMI 総合法律事務所

【氏名又は名称】 稲葉 良幸

特願 2003-188626

ページ： 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社

特願 2003-188626

出願人履歴情報

識別番号

[504224061]

1. 変更年月日

2004年 6月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

広島県広島市南区霞1-2-3 広島大学大学院医歯薬学総合  
研究科

氏 名

越智 光夫